

特許協力条約

E P · U S

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
(P C T 18条、P C T 規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 Y C T - 6 0 1	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 1 / 0 3 9 0 9	国際出願日 (日.月.年) 10.05.01	優先日 (日.月.年) 10.05.00
出願人(氏名又は名称) サントリー株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、スクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が、出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものを承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl' C12N15/16, C12P21/02, C07K14/58

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl' C12N15/00-15/90, C12P21/02, C07K14/58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 62-044198 A (TORAY IND. INC.) 26.2月.1987 (26.02.87) (ファミリーなし)	1-6 7,8
X	JP 61-119189 A (GREEN CROSS CO.) 6.6月.1986 (06.06.86) (ファミリーなし)	1-6
X	EP 683233 A2 (GREEN CROSS CO.) 22.11月.1995 (22.11.95) & US 5612197 A & JP 7-308199 A	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.07.01

国際調査報告の発送日

07.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B 3037



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	EP 164273 A1 (SUNTORY LTD.) 11.12月.1985 (11.12.85) & AU 8543272 A & US 5118615 A & JP 60-262592 A	7,8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03909

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/16, C12P21/02, C07K14/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C12P21/02, C07K14/58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 62-044198 A (Toray Ind. Inc.), 26 February, 1987 (26.02.87), (Family: none)	1-6
Y		7,8
X	JP 61-119189 A (Green Cross Co.), 06 June, 1986 (06.06.86), (Family: none)	1-6
X	EP 683233 A2 (Green Cross Co.), 22 November, 1995 (22.11.95), & US 5612197 A & JP 7-308199 A	1-6
Y	EP 164273 A1 (Suntory Ltd.), 11 December, 1985 (11.12.85), & AU 8543272 A & US 5118615 A & JP 60-262592 A	7,8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 18 July, 2001 (18.07.01)	Date of mailing of the international search report 07 August, 2001 (07.08.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/030452

The PTO did not receive the following
listed item(s)

No Postcard

RECEIVED

JAN 14 2002

PCT INITIAL PROCESSING

PCT REQUEST

Draft (NOT for submission) - printed on 26.12.2001 06:37:31 PM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	10.5.01
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.01.2001)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Japan Patent Office (RO/JP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	YCT-601
I	Title of invention	METHODS FOR REDUCING THE FORMATION OF BYPRODUCTS IN THE PRODUCTION OF RECOMBINANT POLYPEPTIDES
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	SUNTORY LIMITED
II-5	Address:	1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203 Japan
II-6	State of nationality	JP
II-7	State of residence	JP
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	YABUTA, Masayuki
III-1-5	Address:	743-88, Nishi Misono-cho, Tatebayashi-shi, Gunma 374-0038 Japan
III-1-6	State of nationality	JP
III-1-7	State of residence	JP

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT REQUEST

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	SAWANO, Toshihiro
III-2-5	Address:	907-1, Tanaka-cho, Ashikaga-shi, Tochigi 326-0822 Japan
III-2-6	State of nationality	JP
III-2-7	State of residence	JP
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	MASUDA, Yumiko
III-3-5	Address:	4737-1, Nakano, Ohra-machi, Ohra-gun, Gunma 370-0603
III-3-6	State of nationality	Japan
III-3-7	State of residence	JP
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is:	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	OHSUYE, Kazuhiro
III-4-5	Address:	243, Takara-machi, Ohta-shi, Gunma 373-0042
III-4-6	State of nationality	Japan
III-4-7	State of residence	JP
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio
IV-1-2	Address:	YUASA and HARA Section 206, New Otemachi Bldg., 2-1, Otemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004 Japan
IV-1-3	Telephone No.	03-3270-6641
IV-1-4	Facsimile No.	03-3246-0233
IV-1-5	e-mail	yulawpat@yuasa-hara.co.jp

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT REQUEST

IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent	
IV-2-1	Name(s)	IMAI, Shosuke; MASUI, Chuji; KOBAYASHI, Yasushi; TOMITA, Hiroyuki; EJIRI, Hiroko	
V	Designation of States		
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT	
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AU CA CN JP KR US	
V-5	Precautionary Designation Statement in addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	10 May 2000 (10.05.2000)	
VI-1-2	Number	137228/2000	
VI-1-3	Country	JP	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Japan Patent Office (JPO) (ISA/JP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT REQUEST

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	-
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	14	-
IX-3	Claims	1	-
IX-4	Abstract	1	-
IX-5	Drawings	3	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	24	
IX-6	Sequence listing part of description	2	-
IX-7	TOTAL	26	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	Japanese	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio (seal)	
X-2	Signature of applicant, agent or common representative		
X-2-1	Name (LAST, First)	IMAI, Shosuke (seal)	
X-3	Signature of applicant, agent or common representative		
X-3-1	Name (LAST, First)	MASUI, Chuji (seal)	
X-4	Signature of applicant, agent or common representative		
X-4-1	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Yasushi (seal)	
X-5	Signature of applicant, agent or common representative		
X-5-1	Name (LAST, First)	TOMITA, Hiroyuki (seal)	
X-6	Signature of applicant, agent or common representative		
X-6-1	Name (LAST, First)	EJIRI, Hiroko (seal)	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT REQUEST

10-3	Corrected date of actual receipt due later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/JP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年11月15日 (15.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/85945 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/16, C12P 21/02, C07K 14/58

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03909

(22) 国際出願日: 2001年5月10日 (10.05.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-137228 2000年5月10日 (10.05.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 篠田 雅之 (YABUTA, Masayuki) [JP/JP]; 〒374-0038 群馬県館林

市西美園町743-88 Gunma (JP). 澤野俊博 (SAWANO, Toshihiro) [JP/JP]; 〒326-0822 栃木県足利市田中町 907-1 Tochigi (JP). 増田由美子 (MASUDA, Yumiko) [JP/JP]; 〒370-0603 群馬県邑楽郡邑楽町中野4737-1 Gunma (JP). 大末和廣 (OHSUYE, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒373-0042 群馬県太田市宝町243 Gunma (JP).

(74) 代理人: 杉本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF INHIBITING THE FORMATION OF BY-PRODUCT IN THE PRODUCTION OF GENETICALLY MODIFIED POLYPEPTIDE

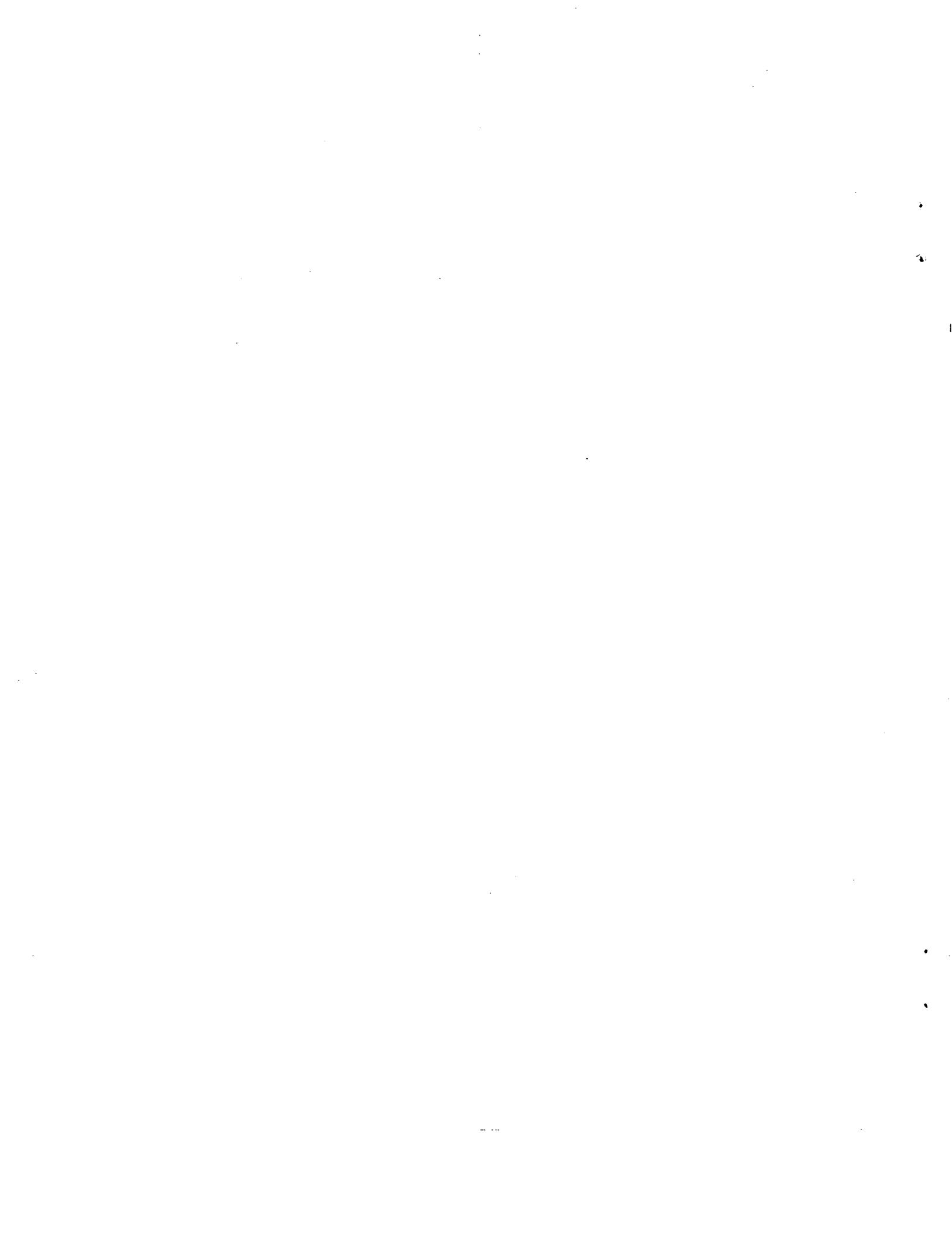
(54) 発明の名称: 遺伝子組換えポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法

(57) Abstract: In a process for producing a polypeptide having serine group by culturing transformed cells, a method of inhibiting the formation of a polypeptide by-product having O-acetylserine group incorporated thereto by adding at least one member selected from among histidine, methionine and glycine to the medium; and a process for producing a polypeptide having serine group by culturing transformed cells characterized in that the formation of a polypeptide by-product having O-acetylserine group incorporated thereto is inhibited by adding at least one member selected from among histidine, methionine and glycine to the medium.

(57) 要約:

形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法において、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加することによりセリン残基の代わりに O-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制する方法、並びに、形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法であって、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加して培養し、セリン残基の代わりに O-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制することを特徴とするセリン残基を含有するポリペプチドの製造方法。

WO 01/85945 A1



明細書

遺伝子組換えポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法

5 技術分野

本発明は、遺伝子組換え技術を用いたポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法及び副生成物の生成を抑制することを特徴とする遺伝子組換えポリペプチドの製造方法に関するものである。

10 背景技術

生理活性ポリペプチドの生産においては遺伝子組換え技術が汎用されている。本来、遺伝暗号の翻訳は通常極めて忠実に行われるが、目的ポリペプチド遺伝子の翻訳時において当該目的ポリペプチドのみならず、コドン表で指定されたアミノ酸とは異なるアミノ酸又はアミノ酸誘導体が取り込まれたポリペプチドが副生成する場合がある。例えば、リボソームの mRNA 翻訳の正確度については、高度に精製されたシステインを含まない大腸菌タンパク質であるフラジエリンに $[^{35}\text{S}]$ Cys が取り込まれる割合から推定した場合、当該アミノ酸が取り込まれる確率はコドン当たり約 10^{-4} であった。抗生物質のストレプトマイシンが存在するとコドン表で指定されたアミノ酸とは異なるアミノ酸が取り込まれる確率が著しく増大し、当該翻訳は Arg コドン (CGU と CGC) が Cys コドン (UGU と UGC) に取り違えられるためと考えられている (ヴォート生化学 (下) , 第 2 版, 東京化学同人, p869-870, 1998)。

また、Tsai らは、ヒト IL-2 の大腸菌内での発現において、本来メチオニンが取り込まれるべき位置に高頻度でノルロイシンが挿入されることを報告している (Tsai, L. B. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 156, p733-739, 1988)。同様の報告がウシソマトロピンの発現 (Bogosian, G. et al., J. Biol. Chem., Vol. 264, p531-539, 1989) にも見出されており、これらは大腸菌のロイシン合成経路の活性化により、細胞内でノルロイシンが合成され、これがメチオニンの代わりにメチオニン tRNA に付加された結果、発現したタンパク質に取り

込まれたものと推定されている。

更にノルロイシンの取り込みとは別に、Apostol らは大腸菌による組換えヘモグロビンの生産において、本来ロイシンが取り込まれるべき位置にノルバリンが取り込まれたことを示している (Apostol I. et al. J. Biol. Chem., Vol. 272, 5 p28980-28988, 1997)。この場合についても、大腸菌のロイシン合成経路の活性化がノルバリンの生成に結びつきロイシンの代わりに取り込まれたものと推測されている。

上記事例のうち、メチオニンの代わりにノルロイシンが目的ポリペプチドに取り込まれる事例においては、発酵培地中のメチオニン及び／若しくはロイシンの 10 濃度を増加させるか、又はノルロイシンの量を減少させるか、あるいは双方を行うことによって、培地中で増殖させた形質転換微生物において発現される異種ポリペプチドへのノルロイシン取り込みを抑制する方法が知られている (日本国特許第 2879063 号、米国特許第 5599690 号)。

一方、本発明者らは、大腸菌を宿主細胞とした遺伝子組換えによるヒト心房性 15 ナトリウム利尿ペプチド (human atrial natriuretic peptide : 以下、hANP と記載することもあり、アミノ酸配列は配列番号 1 に示す通りである :Kangawa, K. et. al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 118, p131-139, 1984) の効率的な生産方法を検討した結果、hANP を融合タンパク質から生産する効率的生産方法の構築に成功した (日本国特許第 1963624 号)。本生産方法において融合タンパク質は、大腸菌 β -ガラクトシダーゼのN末端部分の 97 アミノ酸から成る保護ペプチド、リジン残基を含む 3 アミノ酸残基のリンカー配列 (Gln-Phe-Lys) 及び hANP より構成され、この融合タンパク質遺伝子は pBR322 由来の発現ベクター上にコードされている。融合タンパク質遺伝子の転写は大腸菌由来のラクトースプロモーターにより行われ、発現した融合タンパク質は大腸菌内で封入体 20 として蓄積する。得られた融合タンパク質は変性剤で可溶化後、リジン残基を特異的に認識し切断するプロテアーゼである API (アクロモバクター プロテアーゼ I [Masaki, T. et. al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 660, p51-55, 1981]) を作用させることで hANP が遊離し、クロマトグラフィーによる精製を経て hANP 25 が得られる。

本発明者らはこのhANP生産プロセスを検討していく中で、hANPに物理化学的性質が類似し、クロマトグラフィー操作による分離が容易ではない不純物を見出した。この不純物は分析用の逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）による分析において、hANPの溶出位置のわずか後方に溶出される物質として検出され、酵素反応で切り出されたhANPに対して約5%の割合で存在する（以後この不純物である副生成ポリペプチドをR1と記載する）。また、当該R1は生産スケールで用いられる分取用のHPLCを用いた場合、hANPとはベースライン分離せず、hANPの溶出ピークのテール部分に重なって溶出するため、容易に分離できない性質を有していた。

hANPは急性心不全の治療用医薬品としても使用されており、このように医薬品として使用されるhANPは高純度であることが重要である。現在の生産方法でも充分に医薬品としての純度は確保されているが、精製工程において副生成ポリペプチドであるR1を除去するために収量が減ってしまうことが生産コストの面から問題であった。従って、当該不純物の生成を抑える手段を見出すことは、高純度のhANPを生産する上で重要な課題であった。

遺伝子組換えポリペプチドの製造において、精製工程において不純物である副生成物を除去するために収量が減ってしまうことが生産コストの面から問題となる場合があり、当該副生成物の生成を抑える手段を見出すことは、高純度の遺伝子組換えポリペプチドを生産する上で重要である。従って、本発明は遺伝子組換えポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法及び副生成物の生成を抑制することを特徴とする遺伝子組換えポリペプチドの製造方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明は、形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法において、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加することによりセリン残基の代わりにO-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制する方法を提供する。

本発明はさらに、形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチド

を製造する方法であって、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加して培養し、セリン残基の代わりに O-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制することを特徴とするセリン残基を含有するポリペプチドの製造方法を提供する。

5

図面の簡単な説明

図1は、発現ベクターpGH α 97SII の模式図を示す。

図2は、酵素反応の終了後、融合タンパク質から切り出されたhANPを逆相HPLCで分析した結果を示す。

10 図3は、R1の構造分析に係るマススペクトル分析の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

(1) 不純物R1の同定

本発明者らは、hANPの生産プロセス中に生じる上記不純物について解析すべく、分析用C18逆相高速液体クロマトグラフィーを用いてR1ピークを分取し、その構造解析を行った。分析はマススペクトル分析、アミノ酸配列分析により行った。その結果、R1はhANPに比べ分子量が42だけ大きい物質であることが確認された。またR1のアミノ酸配列を分析したところ、hANPと同じアミノ酸配列であったことから、R1はhANP中のあるアミノ酸が別のアミノ酸と置換されたものではなく、何らかの修飾を受けたアミノ酸が含まれたhANPの誘導体であると判断された。

さらに、もし修飾部位が複数個存在した場合、それらの組み合わせにより生ずる多数の誘導体の出現が考えられるが、実際は分析用HPLCでシングルピークしか得られておらず、このことから修飾部位は1箇所と考えられた。修飾基の構造については、生合成の過程において生ずる修飾反応でかつ分子量が42であったことから、アセチル化されたものであることが考えられる。

アセチル化の部位についてはhANPのアミノ酸配列から、セリン残基、アルギニン残基及びチロシン残基に対する修飾の可能性が考えられるため、まずhANPのC末端に1箇所存在するチロシン残基についてC末端アミノ酸分析を行つ

たところ、R 1 の C 末端アミノ酸はチロシンであることが判明し、チロシン残基における修飾の可能性は否定された。さらにアルギニン残基についてはアルギニンを特異的に認識するプロテアーゼ（トリプシン）の切断が R 1 においても正常に行われることからその可能性は低いと考えられる。従って、アセチル化はセリ 5 ソン残基において生じているものと判断した。これはセリンのアセチル体である O-アセチルセリン残基は細胞内で合成されることが判明しており、ポリペプチドへの翻訳時にセリン残基の代わりに取り込まれる可能性があることからも十分に考 10 えられる。また、R 1 がポリペプチドへの翻訳時に生じていることは、融合タンパク質から hANP を遊離させた時点から R 1 が検出できることからも推測され 15 る。従って、R 1 に生じた修飾は、融合タンパク質の発現時に生じたものであり、精製過程で生じたものではないと判断された。

（2）不純物 R 1 の生成抑制

本発明者らは培養工程において R 1 の生成を減少させることを検討した。大腸菌を宿主細胞として組換えペプチドを生産した場合、分子量を 42 だけ大きくするような修飾についての報告はなく、従って、R 1 に関して生成を抑制する手段について全く不明であった。そこで本発明者らは、タンパク質の構成成分であるアミノ酸に着目し、培地へアミノ酸を添加することで当該アミノ酸の生合成を抑制し、O-アセチルセリン等の生合成中間体の生成を抑制することにより R 1 の生成を抑制することを試みた。

20 検討は 18 種類 (L-アラニン、グリシン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-メチオニン、L-システイン、L-トリプトファン、L-プロリン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-スレオニン、L-アルギニン、L-リジン及び L-ヒスチジン) のアミノ酸のいずれかを添加して hANP 生産菌を培養し、hANP 及び R 1 の生成量を比較することにより行った。

なお、L-バリン添加は菌の増殖阻害を引き起こすため実施しなかった。また L-チロシンの添加はチロシンの溶解度が低く、大量培養時に不適切と考えられたため検討しなかった。

検討の結果、18 種類の L-アミノ酸のうち、グリシン、ヒスチジンあるいはメ

チオニンの添加がR 1 生成を 50%以上抑制し、これらのアミノ酸の添加がR 1 生成の抑制の効果が大きいことが明らかになった。即ち、これらのアミノ酸を培地へ添加することで、R 1 の生成が抑制されること、また菌体当たりの封入体生産量も増加させる効果もあることが明らかとなり、高純度のh ANP を大量生産する際に有用な方法であることが判明した。なお、上記アミノ酸の添加量は、培養終了時点においても、添加したアミノ酸（グリシン、ヒスチジン及び／又はメチオニン）の宿主細胞における生合成が抑制される量を培地中に添加すればよく、例えば、培養中に培地中のアミノ酸含有量をモニターしてそれが欠乏しないように適宜添加してもよい。また菌体のアミノ酸組成（Frederick C.H. et al., 10 Chemical Composition of *Escherichia coli* in *Escherichia coli* and *Salmonella*, second edition, ASM press, p.13-16 に記載）、得られる菌体濃度、発現させるタンパク質のアミノ酸組成及びその発現量により、必要とされる添加アミノ酸量を算出し、それが培養終了時点においても十分に残存する量を最初から培地に添加することも可能である。

15 本発明の実施例においてはグリシン、ヒスチジン又はメチオニンについてそれぞれのアミノ酸を単独で添加した場合についての検討を実施したが、これらを組み合わせることにより、さらにR 1 の生成が抑制されることは十分に期待できる。

また発明者らはh ANP 生産を例にこれらの検討を実施したが、遺伝子組換え技術を用いたポリペプチドの生産において+42 の分子量を与える不純物の生成は 20 h ANP 以外のペプチド又はタンパク質（特にセリンを含有するもの）を生産する場合でも十分に起こり得るものであり、本方法は遺伝子組換えで生産するペプチド又はタンパク質に広く適応できる。また、ペプチド又はタンパク質の構造によつては、1 個のセリン残基のみならず、複数のセリン残基を有する場合があり、その複数のセリン残基の 1 箇所以上にO-アセチルセリン残基が取り込まれた副 25 生成物が 1 種類以上生成することが考えられ、本発明はそれらの生成の抑制をすることも期待できる。

本発明において適応が可能なペプチドの例としては、A-type Natriuretic Peptide、B-type Natriuretic Peptide、Bradykinin、Big Gastrin、Calcitonin、Calcitonin gene related peptide、Corticotropin Releasing Factor、Cortistatin、

C-type Natriuretic Peptide、Defesin 1、Elafin、 α -Endorphin、 β -Endorphin、 γ -Endorphin、Endothelin-1、Endothelin-2、Big Endothelin-1、Big Endothelin-2、Big Endothelin-3、Enkephalin、Galanin、Big Gastrin、Gastric Inhibitory Polypeptide、Ghrelin、Glucagon、Glucagon-like peptide -1、Glucagon-like peptide -2、Growth Hormone Releasing Factor、Histatin 5、Insulin、Joining Peptide、Luteinizing Hormone Releasing Hormone、Melanocyte Stimulating Hormone、Midkine、Neurokinin A、Neuropeptide Y、Neurotensin、Oxytocin、Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptide、Parathyroid Hormone、PTH related peptide、Peptide Histidine-Methionine-27、Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 38、Platelet Factor -4、Peptide T、Secretin、Serum Thymic Factor、Somatostatin、Urocortin、Vasoactive Intestinal Peptide 及びこれらの誘導体が挙げられ、タンパク質の例としては Growth Hormone 及びその誘導体を挙げることができる。

本発明では、セリン残基を含有するポリペプチドの分子量が約 1000～2000であるポリペプチドについて実施することが好ましい。また、セリン残基を含有するポリペプチドが、心房性ナトリウム利尿ペプチドであることがより好ましく、心房性ナトリウム利尿ペプチドが、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドであることが最も好ましい。

本発明に用いることができる宿主細胞は、遺伝子組換えポリペプチドの製法に用いることができるものであれば特に限定されるものではない。例えば、原核細胞又は真核細胞の何れでもよく、原核細胞としては細菌（大腸菌、枯草菌等）、真核細胞としては酵母（*Saccharomyces* 属等）、動物細胞（CHO 細胞等）を挙げができる。宿主細胞としては、細菌、酵母などを含む微生物が好ましく、特に大腸菌が好ましい。

即ち、本発明は以下のものに関する。

a) 形質転換細胞を培養して遺伝子組換えポリペプチドを製造する方法において、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加することにより、副生成物であるポリペプチドの生成を抑制する方法、

b) 形質転換細胞を培養して遺伝子組換えポリペプチドを製造する方法であって、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加して培養し、副生成物であるポリペプチドの生成を抑制することを特徴とする遺伝子組換えポリペプチドの製造方法、

5 c) 副生成ポリペプチドの分子量が遺伝子組換えポリペプチドに対して+42の修飾を受けた誘導体であるa) 又はb) 記載の方法、

d) 副生成ポリペプチドがアセチル化された誘導体であるa) 乃至c) 記載の方法、

e) 遺伝子組換えポリペプチドがセリンを分子内に有するポリペプチドであるa)

10 f) 遺伝子組換えポリペプチドの分子量が約1000～20000であるa) 乃至e) 記載の方法、

g) 遺伝子組換えポリペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチドであるf) 記載の方法、

15 h) 心房性ナトリウム利尿ペプチドがヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドであるg) 記載の方法、

i) 形質転換細胞を培養して遺伝子組換えポリペプチドを製造する方法において、宿主細胞が原核細胞又は真核細胞微生物であるa) 乃至h) 記載の方法、

j) 宿主細胞が、微生物であるi) 記載の方法、及び

20 k) 微生物が、大腸菌であるj) 記載の方法。

産業上の利用可能性

本発明は、形質転換細胞を培養して遺伝子組換えポリペプチドを製造する方法において、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加することにより副生成物ポリペプチドの生成を抑制する方法、及び副生成物の生成を抑制することを特徴とする遺伝子組換えポリペプチドの製造方法に関するものである。特にセリン残基の代わりにO-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物ポリペプチドの生成を抑制する効果があり、本発明により、高純度の遺伝子組換えポリペプチドを従来よりも低い生産コストで提供することが可能となる。

実施例

以下に、実施例において本発明を詳細に述べる。本発明についての種々の変更、修飾を行うことが当業者には可能であり、従って、本発明は実施例に限定されることなく、これらの変更、修飾をも含むものである。

実施例 1：発現ベクターの作製

大腸菌 β -ガラクトシダーゼのN末端部分の 97 アミノ酸から成る保護ペプチド（配列番号 2）、リジン残基を含む 3 アミノ酸残基のリンカー配列（Gln-Phe-Lys）及び hANP（配列番号 1）より構成される融合タンパク質をコードする遺伝子を、BamI-PvuII 領域を欠失させた pBR322（Nature. 1980; 283 :216-8）の EcoRI、DraI 部位にクローニングし、発現ベクター pGH α 97SII を作製した（図 1：融合タンパク質遺伝子配列は省略）。発現ベクターの構築方法は常法に従った。

実施例 2：R 1 の同定

15 (1) 培養及び封入体回収

上記の発現プラスミドが導入された大腸菌 W3110 株（W3110/pGH α 97SII）を、ジャーファーメンターを用いて表 1 に示す NU 培地を用いて培養した。

表 1 NU培地の組成（培地 1L 当たり）

酵母エキス	4 g
リン酸 2 水素カリウム	4 g
リン酸水素 2 カリウム	4 g
リン酸水素 2 ナトリウム	2.8 g
塩化アンモニウム	0.2 g
硫酸アンモニウム	1.2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	40 mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	40 mg
$MnSO_4 \cdot nH_2O$	10 mg
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	10 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	4 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	2 mg
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	1 mg
H_3BO_4	0.5 mg
テトラサイクリン塩酸塩	2 mg

培養はグルコース濃度 4.5%、33°C、pH7.0、溶存酸素濃度 30%の条件で行い、
 5 pH 及び溶存酸素濃度はそれぞれアンモニア水の滴下、攪拌回転数の上昇により
 制御した。グルコースが消費された後、培養温度を 37°C に制御してグリセロール
 を炭素源として逐次添加することにより、hANP 融合タンパク質の発現を促し、
 約 30 時間の培養を行った。培養後の菌体には封入体の形成が認められ、発現し
 た融合タンパク質は全菌体タンパク質の 30%以上であった。

10 培養後、マントンゴーリンホモジナイザー(15M-8AT)を用いて、培養液を
 500Kg/cm² の条件でホモジナイズ処理し、遠心機により沈殿画分（封入体）を回
 収した。次に、培養液と等量の 30mM Tris·HCl (pH9.3)緩衝液を添加し、懸濁後、
 再度遠心分離を行い、沈殿を回収した。この洗浄操作をさらにもう一度繰り返し、
 最終的に得られた沈殿を適量の 30mM Tris·HCl (pH9.3)緩衝液に懸濁した。

15 (2) R 1 の検出
 次に、得られた封入体を 5M 尿素を含む 30mM Tris·HCl (pH9.3)緩衝液に懸
 濁・溶解した。封入体は水に懸濁した場合、OD660 値が 220 になる分量を使用し

た。この封入体溶解液に、3.5 ユニット/L の割合で API (和光純薬) を添加し、30 ℃で 1.5 時間切断反応を実施した。図 2 は酵素反応の終了後、切り出された hANP を逆相 HPLC で分析したものである。分析はカラム温度 40℃、流速 1ml/min.、A 液；トリフルオロ酢酸溶液 (1→1000)、B 液；アセトニトリル・5 トリフルオロ酢酸溶液 (0.95→1000) 混液 (1:1) を使用し、B 液の初期濃度を 43% とし、分析開始後 B 液を一定量ずつ増加させて、16 分間で 52% となるようなグラジエント法により行った。R 1 は hANP に対する相対溶出時間が 1.1 の不純物として検出された。

(3) R 1 の精製

10 次に、R 1 の構造分析のため、R 1 の精製を行った。酵素処理の終了後の反応液に pH が 5.0 となるように酢酸を添加し、保護ペプチドを沈殿させた後、沈殿を遠心分離で除去した。次に、2.5M 尿素を含む 50 mM 酢酸アンモニウム液 (pH5.0) で平衡化した CM-トヨパール (TOSOH) に上清を添加して、R 1 及び hANP を吸着させた後、塩化ナトリウムの塩濃度勾配で溶出させ、hANP 15 及び R 1 を含む画分を分取した。

得られた分画に 20% (vol/vol) に相当する量の酢酸を加え、オクタデシル (C18) をリガンドとする逆相系カラム (soken ODS) に通液し、hANP をカラムに吸着させた後、アセトニトリル濃度勾配により hANP を溶出させ、hANP 及び R 1 を含む画分を分取した。

20 このようにして得られた分画を分析用逆相 HPLC カラム (YMC-Pack ODS-A-302 : 4.6mm x 150mm) にかけ、R 1 のピークを分取することで、高純度の R 1 を得た。

(4) R 1 の構造分析

25 R 1 の構造分析は、エドマン法による N 末端からのアミノ酸配列、及びマススペクトル (エレクトロスプレー・イオニゼーション法) による分子量測定により行った。その結果、N 末端からの配列は hANP の配列に一致していることが判明した。一方、マススペクトル分析の結果は分子量 3122 となり、hANP の分子量 3080 に比べ 42 だけ大きい分子であることが明らかとなった (図 3)。これらの分析結果を考察したところ、R 1 は何らかの修飾を受けた hANP であると

推測された。この修飾基については+42の分子量及び細胞内で生じる修飾反応であることからアセチル基と推測された。hANPのアミノ酸配列からは、セリン残基、アルギニン残基及びチロシン残基に対する修飾の可能性が考えられるが、特にセリン残基での修飾の可能性が高いと考えられた。これはセリンのアセチル体であるO-アセチルセリンが細胞内で合成されることが知られており(Kredich, N. M. :Biosynthesis of cystein in Escherichia coli and Salmonella, second edition ASM press, p514-527)、ポリペプチドへの翻訳時にO-アセチルセリンがセリンの代わりに取り込まれると考えられるためである。

10 実施例3：アミノ酸の添加とR1の生成抑制

(1) 培養

W3110/pGH α 97SIIの凍結保存菌を100mlのLBD培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%ブドウ糖、0.1Mリン酸カリウム緩衝液[pH7.0])に接種し、37℃で約7時間振盪培養を行った。得られた培養液に最終濃度10%になるようにグリセロールを添加したのち1mLずつバイアル20本に分注し、凍結保存を行い以降の実験に用いた。

この凍結保存菌を200mLの表1のNU培地(但し、pH7.2、炭素源にはグルコース(4g/L)を使用し、酵母エキス0.1g/Lに変更したもの)に植え、33℃で一晩振盪培養した。菌体を遠心により集菌し、生理食塩水(0.9%NaCl)で一度洗浄し、最初の菌体濃度の7倍から8倍になるように生理食塩水(0.9%NaCl)を適量加え懸濁した。

次に、この菌体懸濁液2mLを、L-アラニン、グリシン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-メチオニン、L-システイン、L-トリプトファン、L-プロリン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-スレオニン、L-アルギニン、L-リジン及びL-ヒスチジンのいずれかを3g/Lの濃度で含む100mLのNU培地(但し、pH6.9-7.0、酵母エキスは0.1g/L、炭素源にはグリセリン(10g/L)を使用)に添加し、37℃で一晩培養した。

(2) 封入体回収及びR1の生成抑制

各フラスコの培養液から遠心分離（7000rpm、20分）により菌体を回収後、5mlの脱イオン水に懸濁し、超音波細胞破碎機により破碎処理を行った。次に、遠心分離（12000rpm、5分）により封入体を沈殿画分に回収し、5mlの30mM Tris・HCl (pH9.3)緩衝液で懸濁し、再度遠心分離（12000rpm、5分）を行い、

5 封入体の洗浄及び濃縮を行った。

次に、得られた封入体を5M 尿素を含む30mM Tris・HCl (pH9.3)緩衝液1mLに懸濁・溶解した。封入体は1mLの水に懸濁した場合、OD660値が22になる分量を使用した。融合タンパク質からのhANPの遊離は、0.004 ユニット/mL 反応液のAPIプロテアーゼ（和光純薬）を添加し、30℃で約150minの反応により

10 行った。反応後、遠心分離（12000rpm、5分）を行い、得られた上清300μLに13.5～15.5μLの5%酢酸を添加し、450μLの精製水で希釈した。この操作で生じた沈殿は遠心分離（12000rpm、5分）により除去し、上清をHPLC（カラム：YMC-Pack ODS-A302）で分析した。R1濃度は、hANPに対するピークのエリアの面積比により算出した。

15 表2はhANPに対するR1の生成量を相対比較したものである。

表2 hANPに対するR1の生成量の比較

添加アミノ酸	hANPに対するR1の相対比率（%）	単位菌体あたりの封入体生産量（相対比）
添加なし	8.97	1.00
L-Lysine	6.42	1.88
L-Threonine	5.48	1.95
L-Methionine	4.15	1.84
L-Alanine	5.00	1.30
L-Tryptophan	10.08	0.76
L-Serine	5.24	1.24
L-Glycine	4.26	1.25
L-Histidine	3.71	1.39
L-Isoleucine	5.90	1.22
L-Glutamic acid	5.57	1.68
L-Glutamine	6.10	1.16
L-Arginine	5.02	1.92
L-Aspartic acid,	6.83	1.87
L-Asparagine	6.35	1.86
L-Proline	9.01	1.62

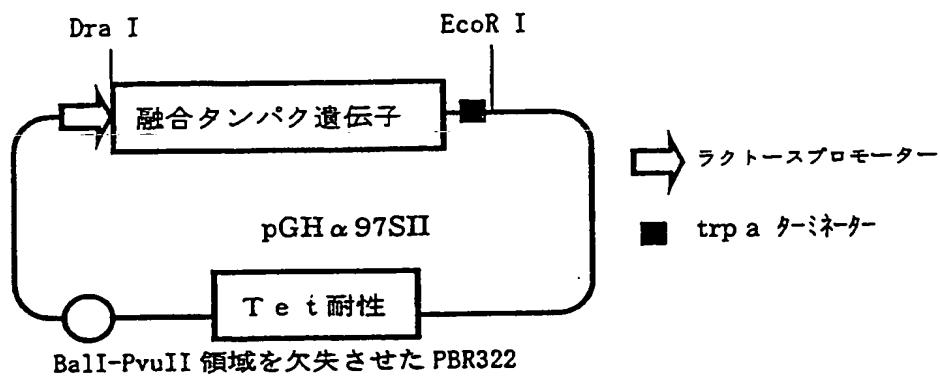
その結果、検討を行ったアミノ酸の内、ヒスチジン、メチオニンあるいはグリシンの添加はR 1 の生成抑制に効果が大きく、対照（アミノ酸を添加しない場合）に比べ、50%以上R 1 の生成量が減少することが判明した。またこれらのアミノ酸の添加は菌体当たりの封入体生産量を増加させる効果があることが明らかとな
5 った。R 1 生成抑制効果のあるヒスチジン、メチオニンあるいはグリシンの中では、封入体生産量を含めて考慮した際に、メチオニン添加がh AN Pに対するR 1 生成量が最も低く、R 1 の生成抑制に効果的であることが判明した。

なお、L-ロイシン、L-フェニルアラニン、及びL-システインは、融合タンパク質発現を低下させたため、封入体が回収できず、これらのアミノ酸の添加はh
10 AN P生産に有効でないことが明らかとなった。

請求の範囲

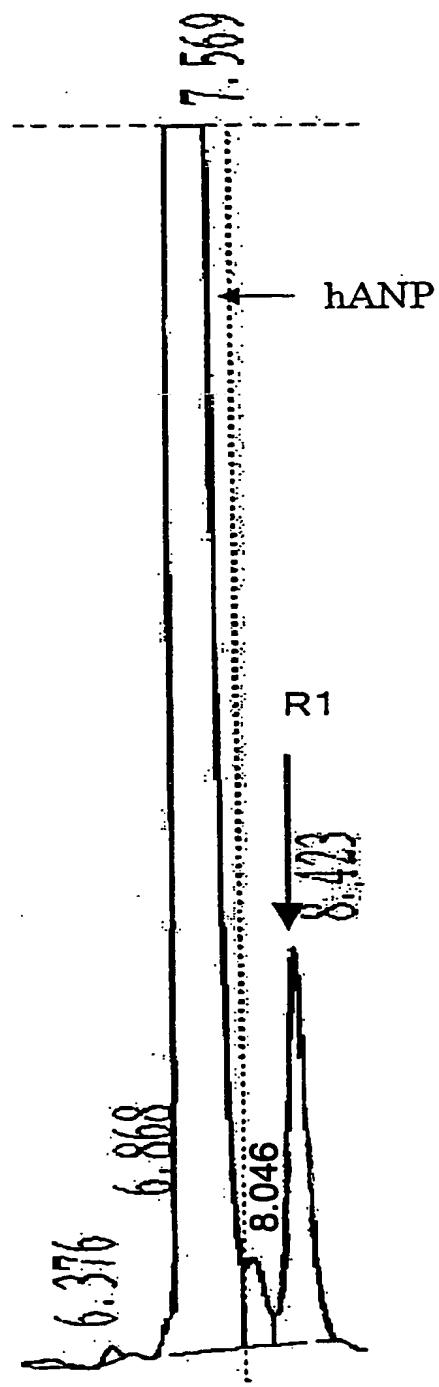
1. 形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法において、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加することによりセリン残基の代わりに O-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制する方法。
5
2. 形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法であって、ヒスチジン、メチオニン又はグリシンの少なくとも一つを培地に添加して培養し、セリン残基の代わりに O-アセチルセリン残基が取り込まれた副生成物であるポリペプチドの生成を抑制することを特徴とするセリン残基を含有するポリペプチドの製造方法。
10
3. 形質転換細胞を培養してセリン残基を含有するポリペプチドを製造する方法において、宿主細胞が原核細胞又は真核細胞である請求項 1 乃至 2 記載の方法。
15
4. 宿主細胞が、微生物である請求項 3 記載の方法。
5. 微生物が、大腸菌である請求項 4 記載の方法。
16
6. セリン残基を含有するポリペプチドの分子量が約 1000～2000 である請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の方法。
17
7. セリン残基を含有するポリペプチドが、心房性ナトリウム利尿ペプチドである請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の方法。
18
8. 心房性ナトリウム利尿ペプチドが、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドである請求項 7 記載の方法。
19

THIS PAGE BLANK (USPTO)

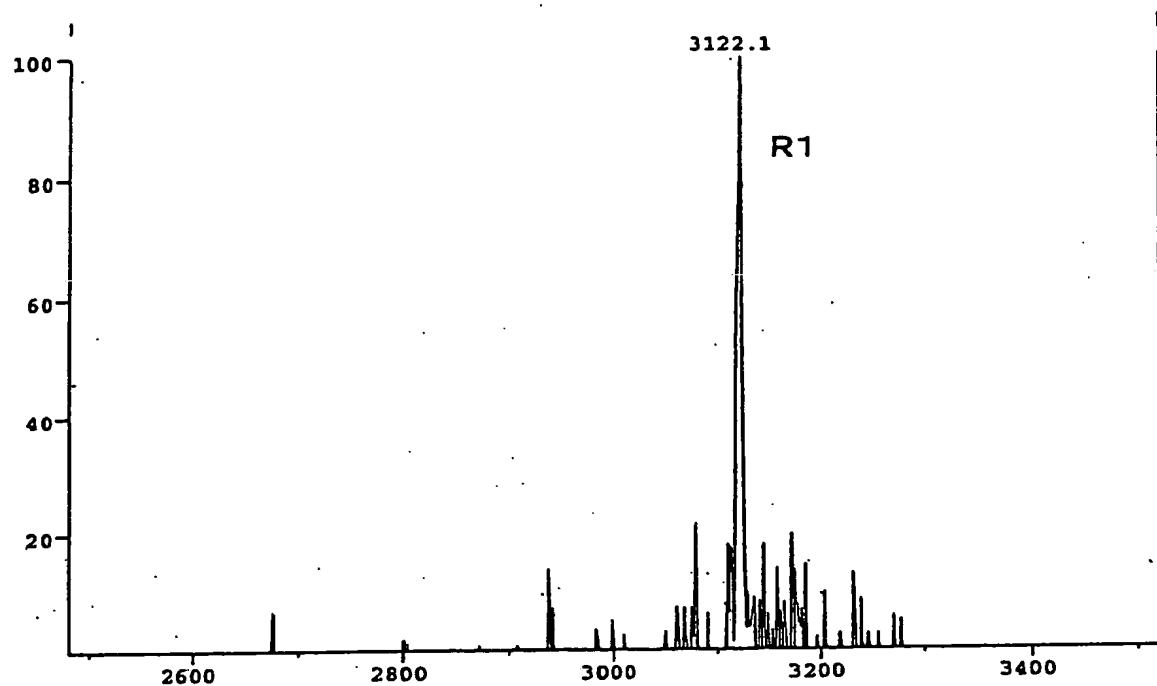
Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110>サントリー株式会社

<120>遺伝子組換えポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法

5 <130>YCT-601

<160>2

<210>1

<211>28

10 <212>PRT

<213>ヒト

<223>hANP

<400>1

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly

15 1 5 10 15

Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20 25

<210>2

<211>97

20 <212>PRT

<213>Escherichia coli

<223>N terminal of β -galactosidase

<400>2

Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp

25 1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro

20 25 30

Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser

35 40 45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro
50 55 60
Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro Glu
65 70 75 80
5 Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp
85 90 95
Ala

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03909

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.C1⁷ C12N15/16, C12P21/02, C07K14/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.C1⁷ C12N15/00-15/90, C12P21/02, C07K14/58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 62-044198 A (Toray Ind. Inc.), 26 February, 1987 (26.02.87), (Family: none)	1-6
Y	JP 61-119189 A (Green Cross Co.), 06 June, 1986 (06.06.86), (Family: none)	7, 8
X	EP 683233 A2 (Green Cross Co.), 22 November, 1995 (22.11.95), & US 5612197 A & JP 7-308199 A	1-6
Y	EP 164273 A1 (Suntory Ltd.), 11 December, 1985 (11.12.85), & AU 8543272 A & US 5118615 A & JP 60-262592 A	7, 8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

• Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
18 July, 2001 (18.07.01)

Date of mailing of the international search report
07 August, 2001 (07.08.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl' C12N15/16, C12P21/02, C07K14/58

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl' C12N15/00-15/90, C12P21/02, C07K14/58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 62-044198 A (TORAY IND. INC.) 26.2月.1987 (26.02.87) (ファミリーなし)	1-6 7,8
X	JP 61-119189 A (GREEN CROSS CO.) 6.6月.1986 (06.06.86) (ファミリーなし)	1-6
X	EP 683233 A2 (GREEN CROSS CO.) 22.11月.1995 (22.11.95) & US 5612197 A & JP 7-308199 A	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.07.01

国際調査報告の発送日

07.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 勉

4B 3037



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	EP 164273 A1 (SUNTORY LTD.) 11.12月.1985 (11.12.85) & AU 8543272 A & US 5118615 A & JP 60-262592 A	7, 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)